

福清黑松醇溶蛋白的群体遗传分析

吴若菁¹, 赖文胜², 方炜², 阮少宁³

(1. 福建师范大学生物工程学院, 福建福州 350007; 2. 福建省林业厅种苗站, 福建福州 350003; 3. 福建农林大学林学院, 福建福州 350002)

摘要: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对福清黑松群体进行醇溶蛋白的多样性分析, 共获得 40 种图谱, 9 个等位基因位点。对这些位点的统计分析表明, 福清黑松的多态位点百分率 $P=55.56\%$, 等位基因平均数 $A=3.00$, 平均等位基因有效数目 $A_e=2.28$, 预期杂合度 $H_e=0.533$, 平均实际杂合度 $H_o=0.402$, 固定指数 F 仅为 $0.246 > 0$ 。该群体表现出遗传多样性水平较高, 但该群体偏离了 Hardy-Weinberg 平衡定律, 原因可能是取样偏差、群体中个体密度分布不均和个体生长状况不好, 不能产生充分的随机交配, 出现遗传漂移导致的。

关键词: 黑松; 醇溶蛋白电泳分析; 遗传多样性

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)01-0053-06

Population Genetics Diversity of Gliadin of *Pinus thunbergii* from Fuqing

WU Ruo-jing¹, LAI Wen-sheng², FANG Wei², RUAN Shao-ning³

(1. Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 2. Forestry Department of Fujian Province, Fuzhou 350003, China; 3. Forestry College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Genetic variation of gliadin from endosperm were examined of 40 individuals of *Pinus thunbergii* population in an area of 7.1 hm² Fuqing natural forest in Fujian Province. Forty patterns of gliadin diversity and 9 loci were obtained by using polyacrylamide gel electrophoresis. The results indicate that the proportion of polymorphic loci (P) was 55.56, mean number of alleles per locus (A) was 3.00, mean effective number of alleles per locus (A_e) was 2.28, mean expected proportion of heterozygous loci (H_e) was 0.533, mean observed proportion of heterozygous loci (H_o) was 0.402, and the fixation index (F) $0.246 > 0$. The population exhibits high genetic diversity, which deviates from Hardy-Weinberg's equilibrium law. This is probably due to sampling error, or unevenness of stand or poor growth of the individuals, resulting in inefficiency of random mating and genetic drift.

Key words: *Pinus thunbergii*; Gliadin electrophoresis analysis; Genetic diversity;

黑松 (*Pinus thunbergii* Parl.) 生长速度较快, 树形美观, 具有耐干旱瘠薄, 抗松干蚧、松毛虫等危害的特点, 有较强的抗性, 是山东及福建沿海地区重要的造林绿化树种。中国于 20 世纪 20 年代引进黑松, 北起大连、旅顺, 南至台湾沿海地区及内陆部分地区均有栽培。黑松群体在长期进化的因素作用下, 形成了一定的遗传结构和较丰富的遗传变异。我国对黑松的研究主要集中在林学和群落学方面, 有关

黑松的遗传结构、遗传多样性方面的研究很少。Son 等^[1]、Hamrick^[2]、Kim 等^[3]曾应用同工酶技术分析黑松的遗传结构。而利用醇溶蛋白电泳技术, 对黑松进行遗传多样性分析则未见报道。

醇溶蛋白是植物种子发育特定时期的产物, 其组成受控于基因, 几乎不受环境的影响。因此, 醇溶蛋白组分上的差异, 可以反映出基因组的差异。近几年来许多研究者将醇溶蛋白电泳分析应用到作

物的遗传育种、种子鉴定、资源保存利用以及物种起源、演化分类、遗传多样性研究等方面^[4-15]。本试验利用黑松的种子胚乳进行醇溶蛋白电泳分析,研究黑松群体遗传多样性及变异情况,为黑松遗传育种、资源保存利用、系统演化提供基础资料和科学依据。

1 材料和方法

材料 取自福建省福清高山镇黑松天然林,位于东经 119°33', 北纬 25°28', 林分面积 7.1 hm², 密度为 312 株 hm⁻², 平均树龄 15 a, 平均树高 3.1 m, 平均胸径 12.1 cm, 结果株数 300 株 hm⁻², 采种树间距为 5 倍树高, 分株采种, 每株 10 个球果, 共采集 40 株, 分株净种, 4℃ 贮藏种子。

样品制备 浸种 24 h, 剥取胚乳, 每个胚乳加样品提取液(2-巯基乙醇 1 ml, 2-氯乙醇 20 ml, 尿素 18.0 g, 甲基绿 0.05 g, 混合后用蒸馏水定容至 100 ml) 0.5 ml, 研磨成浆, 室温浸提过夜。12 000×g 离心 10 min, 取上清液备用。

凝胶、电泳、固定和染色 按吴若菁^[4]的方法。

基因型分析 每单株分析 6-10 粒种子的胚乳, 确定基因型, 当基因位点为异质时, 其等位基因分离比例应为 1:1, 采用经过 Yates 矫正的 χ^2 进行检验。

等位基因频率检测与统计 检测了 337 粒种子的胚乳谱带, 按已确定各位点的各等位基因图谱表型直接计算。多肽位点的标准是指第 2 个等位基因的频率超过 0.1。

统计分析 按王中仁先生^[16]的方法, 分析群体的多肽位点百分数(P)、每个位点基因平均数(A)、平均每个位点等位基因有效数目(Ae)、平均每个位点的预期杂合度(He)、平均每个位点的实际杂合度多肽位点百分数(Ho)和群体的固定指数(F) 6 个群体遗传多样性指数。

2 结果和分析

以单倍体的胚乳为材料, 分株测定, 共检测 40 株, 每株检测 8-10 粒种子的胚乳, 共获得 337 个有效样品, 发现该黑松群体中存在有 40 种类型的醇溶蛋白图谱, 群体内的杂合单株的醇溶蛋白图谱的表型分离, 经 χ^2 检验, 符合孟德尔 1:1 的分离比(图 1、表 1)。在这 40 种醇溶蛋白图谱中, 共获得 9 个位

表 1 黑松胚乳的基因分离型和 χ^2 检验

Table 1 Gene segregation type of *Pinus thunbergii* endosperm and χ^2 test

树号 Tree No.	样品数 No. of samples	分离的基因型 Segregation genotype	分离比例 Segregation ratio	χ^2	P Probability
1	9	1:2	4:5	0.0	1.0
3	10	3:4	5:5	0.0	1.0
4	10	5:6	5:5	0.0	1.0
7	10	6:7	5:5	0.0	1.0
8	10	8:9	6:4	0.1	0.8-0.7
9	10	10:11	5:5	0.0	1.0
10	10	12:13	5:5	0.0	1.0
11	10	14:15	5:5	0.0	1.0
12	11	15:16	6:5	0.0	1.0
15	9	18:19	5:4	0.0	1.0
16	10	20:21	5:5	0.0	1.0
17	10	22:23	5:5	0.0	1.0
19	9	24:25	5:4	0.0	1.0
20	10	24:25	5:5	0.0	1.0
21	10	26:27	5:5	0.0	1.0
22	10	28:29	6:4	0.1	0.8-0.7
23	10	30:31	5:5	0.0	1.0
24	10	32:33	5:5	0.0	1.0
25	10	34:35	4:6	0.1	0.8-0.7
26	9	36:37	5:4	0.0	1.0
28	10	37:38	5:5	0.0	1.0
29	10	37:39	5:5	0.0	1.0
30	10	38:40	5:5	0.0	1.0

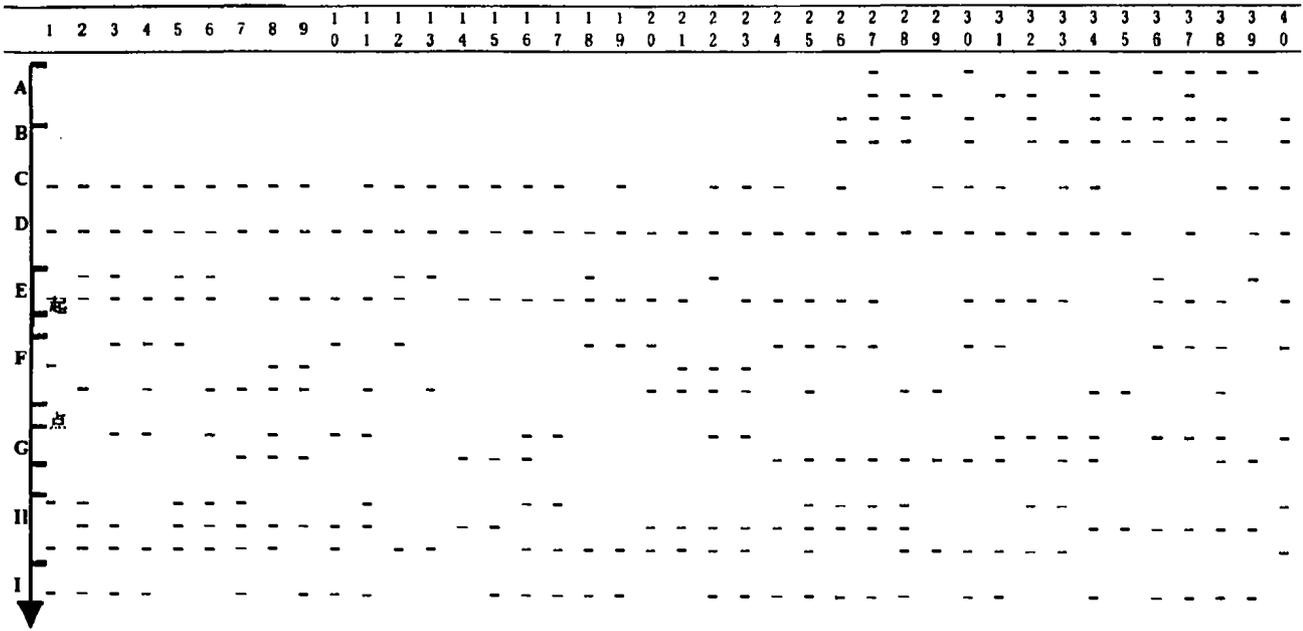


图 1 黑松群体醇溶蛋白电泳谱类型

Fig. 1 Electrophoretic pattern from gliadin of *Pinus thunbergii* population

点, 其中 B、C、D、I 4 个位点为单肽位点, A、E、F、G、H 5 个位点为多肽位点。这 5 个多肽位点各有等位基因数 3-6 个; 有 3 个是高活性位点区, 分别为 F、G、H 基因位点。对群体内各位点的杂合单株中两个等位基因的分离比进行 χ^2 检验均符合 1:1 孟德尔

分离比率(表 2、图 2)。说明是属于同一位点上不同等位基因所控制的。

对福清黑松群体遗传多样性衡量指标的分析结果为: 多肽位点百分数(P)=55.56%, 每个位点基因平均数(A)=3.00, 平均每个位点等位基因有效数

表 2 各位点等位基因的分离及 χ^2 检验

Table 2 Allele segregation per locus and χ^2 test

位点 Locus	树号 Tree No.	样品数 No. of samples	分离的等位基因型 Segregation allele type	分离比例 Segregation ratio	χ^2	P Probability
A	21	10	A ₁ :A ₂	5:5	0.0	1.0
	30	10	A ₁ :A ₃	5:5	0.0	1.0
	22	10	A ₃ :A ₆	5:5	0.0	1.0
	23	10	A ₃ :A ₆	5:5	0.0	1.0
	24	10	A ₂ :A ₄	V	0.0	1.0
	25	10	A ₂ :A ₁	4:6	0.1	0.8-0.7
	26	9	A ₂ :A ₃	5:4	0.0	1.0
	28	10	A ₂ :A ₃	5:5	0.0	1.0
E	1	9	E ₁ :E ₂	4:5	0.0	1.0
	3	10	E ₁ :E ₂	5:5	0.0	1.0
	10	10	E ₃ :E ₁	5:5	0.0	1.0
	15	9	E ₁ :E ₂	4:5	0.0	1.0
	17	10	E ₁ :E ₃	5:5	0.0	1.0
	26	9	E ₂ :E ₁	5:4	0.0	1.0
	29	10	E ₁ :E ₃	5:5	0.0	1.0
F	1	9	F ₁ :F ₂	4:5	0.0	1.0
	3	10	F ₃ :F ₄	5:5	0.0	1.0
	4	10	F ₃ :F ₂	5:5	0.0	1.0
	9	10	F ₃ :F ₁	5:5	0.0	1.0
	10	10	F ₃ :F ₁	5:5	0.0	1.0
	16	10	F ₄ :F ₅	5:5	0.0	1.0
	19	9	F ₃ :F ₄	5:4	0.0	1.0

续表 2 (Continued Table 2)

位点 Locus	树号 Tree No.	样品数 No. of samples	分离的等位基因型 Segregation allele type	分离比例 Segregation ratio	x^2	P Probability
G	7	10	G ₁ :G ₂	5:5	0.0	1.0
	8	10	G ₃ :G ₂	6:4	0.1	0.8-0.7
	12	11	G ₂ :G ₃	6:5	0.0	0.1
	24	10	G ₁ :G ₃	5:5	0.0	0.1
	25	10	G ₁ :G ₂	4:6	0.1	0.1
	28	10	G ₁ :G ₃	5:5	0.0	0.1
	29	10	G ₂ :G ₁	5:5	0.0	0.1
H	1	9	H ₁ :H ₂	4:5	0.0	1.0
	3	10	H ₃ :H ₄	5:5	0.0	1.0
	8	10	H ₃ :H ₄	6:4	0.1	0.8-0.7
	9	10	H ₃ :H ₆	5:5	0.0	1.0
	12	11	H ₅ :H ₁	6:5	0.0	1.0
	19	9	H ₅ :H ₂	5:4	0.0	1.0
	22	10	H ₂ :H ₄	6:4	0.1	0.8-0.7
	29	10	H ₁ :H ₅	5:5	0.0	1.0

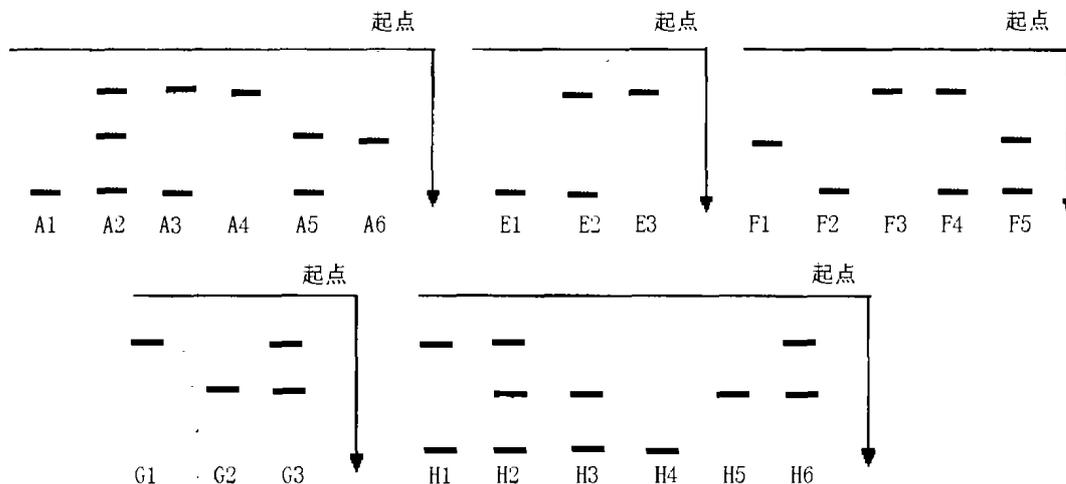


图 2 黑松醇溶蛋白不同位点等位基因图谱

Fig. 2 Patterns of alleles per locus from gliadin of *Pinus thunbergii*

目(Ae)=2.28, 平均每个位点的预期杂合度(He)=0.533, 平均每个位点的实际杂合度多肽位点百分数(Ho)=0.402 (表 3)。

3 讨论

3.1 黑松与马尾松醇溶蛋白结果的对比

吴若菁等^[12]对马尾松与黑松种源核型和模糊聚类分析的结果表明: 马尾松种源间的核型变异程度大于黑松。将黑松与马尾松的醇溶蛋白电泳结果进行对比^[14], 发现: $P_{(马尾松)} = 72.7\% > 55.56\%_{(黑松)}$; $A_{(马尾松)} = 3.636 > 3.00_{(黑松)}$; $Ae_{(马尾松)} = 2.663 > 2.28_{(黑松)}$; $He_{(马尾松)} = 0.552 > 0.533_{(黑松)}$; 这几项指数均高于黑松, 表明马尾松群体的遗传多样性高于黑松。其原因可能有两个: 一个是在长期的进化过程中, 由于马尾松的分布范围比黑松广, 其生存所处的环境比黑松更复

杂, 因此产生的遗传变异也更多。另一个是黑松为我国早期引进树种, 引种中的取样问题可能导致部分遗传变异未被引入, 进而影响到黑松遗传多样性水平的变化。此外, 黑松 $Ho = 0.402$ 大于马尾松 $Ho = 0.231$, 说明黑松群体杂合度高于马尾松, 这可能是因为该黑松群体的密度相对大于所研究的马尾松群体, 所以近交概率比马尾松群体低。

3.2 黑松醇溶蛋白与同工酶的分析结果对比

有研究报道黑松同工酶的 $P = 68.4\%$, $Ae = 1.99$, $He = 0.263$ ^[9], 而黑松醇溶蛋白分析的结果是 $P = 55.56\%$, $Ae = 2.28$, $He = 0.533$, x^2 检验的结果 $x^2 = 2.88$, 概率介于 $P_{0.05}$ 与 $P_{0.1}$ 之间, 二者差异不显著。表明醇溶蛋白与同工酶分析的结果具一致性。

松属植物中同工酶的遗传变异变化很大, 从脂松 (*P. reasiocsis*) 的 $P = 0\%$, 到欧州赤松的 $P = 100\%$,

表 3 黑松群体的遗传多样性指数

Table 3 Genetic diversity data from population of *Pinus thunbergii*

位点 Locus	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency	A	Ae	He	Ho
A	A1	0.134	6.000	3.850	0.965	0.748
	A2	0.403				
	A3	0.252				
	A4	0.084				
	A5	0.050				
	A6	0.076				
B		1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
C		1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
D		1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
E	E1	0.628	3.000	2.004	0.958	0.717
	E2	0.319				
	E3	0.053				
F	F1	0.015	5.000	3.086	0.964	0.732
	F2	0.307				
	F3	0.452				
	F4	0.111				
	F5	0.115				
G	G1	0.542	3.000	2.400	0.929	0.697
	G2	0.322				
	G3	0.136				
H	H1	0.158	6.000	5.181	0.983	0.720
	H2	0.179				
	H3	0.161				
	H4	0.168				
	H5	0.281				
	H6	0.053				
I		1.000	1.000	1.000	0.000	0.000

$P=55.56\%$, $A=3.00$, $Ae=2.28$, $He=0.533$, $Ho=0.402$, $F=0.246 > 0$

平均为 67.7%; A 从 1.00(脂松)到 3.87(火炬松), 平均为 2.29; He 从 0.00(脂松)到 0.364 (*Pinus longaeva*), 平均为 0.210。不同物种显示了不同的变异水平^[2]。相比之下黑松群体的遗传多样性水平属于较高水平。

3.3 福清黑松群体的遗传平衡状态

对醇溶蛋白电泳分析得知黑松群体 $F=0.246$, 表明黑松群体偏离了哈迪-温伯格平衡定律, 群体有存在近亲繁殖现象, 其原因可能有三方面: 一是取样出现偏差; 二是该黑松群体为天然林, 林分中个体分布密度不均。三是黑松在福清生长状况不好, 十几年生的树木平均高度仅达 3.1 m, 胸径为 12.1 cm, 黑松又是风媒异交种, 树体矮小, 花粉传播的距离较近。林木密度分布不均和花粉传播距离近, 不利于完全随机交配。因此, 易出现遗传漂移, 使得群体偏离遗传平衡。

参考文献

- [1] Son D, Hong S, Yeo J, et al. Genetic variation of isozymes in populations of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii* naturally distributed in Kyungpook province [J]. Korean For Soc, 1989, 78: 345-359.
- [2] Hamrick J L. Isozyme and analysis of genetic structure in plant populations [A]. In: Soltis D E, Soltis P S. Isozymes in Plant Biology [M]. Portland, O R: Dioscorides Press, 1989. 87-105.
- [3] Kim Z S, Yi C H, Seok W. Genetic variation and sampling strategy for conservation in *Pinus* species [A]. In: Kim Z S, Hans H H. Conservation and Manipulation of Genetic Resources in Forestry [M]. Kwang Moon Kag: Seoul, 1994. 294-319.
- [4] Jones R W. Electrophoresis and fractionation of wheat gluten [J]. Arch Biochem Biophys, 1959, 84:363-376.
- [5] Zillman R R, Bushuk W. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. II Effects of environmental and experimental factors on the gliadin electrophoregrams [J]. Can J Plant Sci, 1979, 59:281-286.
- [6] Khan K, Hamada A S, Patek J. Polyacrylamide gelelectrophoresis for wheat variety in entification: effect of variables on gelproperties

- [J]. *Cereal Chem*, 1985, 62(5):310–313.
- [7] Draper S R. Standard reference method for the identification of cultivars of wheat and barley by polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Seed Sci Techn*, 1987, 15:431–434.
- [8] Metakovsky E V, Annicchiarico P, Boggini G, et al. Relationship between gliadin alleles and dough strength in Italian bread wheat cultivars [J]. *J Cereal Sci*, 1997, 25(3):229–236.
- [9] Bai Y F(白云凤), Hou B Y(侯变英), Sun S C(孙善澄), et al. Genetic differences of gliadin profiles of black-grained wheat germplasm resources [J]. *Triticeae Crops(麦类作物学报)*, 2002, 22(2):22–25.(in Chinese)
- [10] Lang M L(郎明林), Lu S Y(卢少源), Zhang R Z(张荣芝). Construction of gliadin fingerprints database of the main wheat cultivars grown in North China [J]. *Sci Agri Sin(中国农业科学)*, 2002, 35(3):238–244.(in Chinese)
- [11] Li M W(李名旺), Yu B J(於丙军), Gu D X(顾德兴), et al. Comparison of pollen grains of pinellia and their tuber protein in alcohol [J]. *Wuhan Bot Res(武汉植物学研究)*, 2000, 18(3):250–252.(in Chinese)
- [12] Wu R J(吴若菁), Zeng X(曾侠), Jing Y(景云), et al. Karyotype analysis and fuzzy clustering on different seed sources of *Pinus massoniana* and *Pinus thunbergii* [J]. *J Fujian Coll For(福建林学院学报)*, 1995, 15(2):164–169.(in Chinese)
- [13] Wu R J(吴若菁), Lai W S(赖文胜), Cheng C Y(程朝阳), et al. A study on the alco-protein patterns of *Pinus taeda* et five of *Pinus* [J]. *J Fujian Coll For(福建林学院学报)*, 2000, 20(1):46–48.(in Chinese)
- [14] Wu R J(吴若菁). Genetic diversity of protein in alcohol for *Pinus massoniana* from natural population [J]. *Sci Sil Sin(林业科学)*, 2002, 38(5):160–165.(in Chinese)
- [15] Yang R W(杨瑞武), Zhou S H(周水红), Zheng Y L(郑有良), et al. Gliadin analysis of type species of four genera in Triticeae [J]. *Guihaia(广西植物)*, 2001, 21(3):239–242.(in Chinese)
- [16] Wang Z R(王中仁). *Plant Allozyme Analysis[M]*. Beijing: Science Press, 1998. 145–154.(in Chinese)